

Erich Wünsch, Gerhard Wendlberger und Reinhard Spangenberg

Zur Synthese des Sekretins, IV<sup>1)</sup>

## Darstellung der Sequenz 1—6

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Abteilung für Peptidchemie, München

(Eingegangen am 30. August 1971)

Die Synthese von  $N^\alpha, N^{im}$ -Bis-adamantylloxycarbonyl-L-histidyl-*O*-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-glycyl-*O*-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanin, eines zur Synthese des Sekretins vorgesehenen Fragments mit der Aminosäuresequenz 1—6 des Hormons wird beschrieben.

### The Synthesis of Secretin, IV<sup>1)</sup>

#### Preparation of the Sequence 1—6

The synthesis of  $N^\alpha, N^{im}$ -bis(adamantylloxycarbonyl)-L-histidyl-*O*-tert-butyl-L-seryl-L-asparagyl( $\beta$ -tert-butylester)-glycyl-*O*-tert-butyl-L-threonyl-L-phenylalanine is described, a fragment corresponding to the amino acid sequence 1—6 of secretin and applicable for further synthesis of this hormone.

In drei vorausgehenden Mitteilungen<sup>1-3)</sup> haben wir über die Synthese der Sekretinteilsequenzen 18—27 (= Fragment I), 12—27 (= Fragment II) bzw. 7—11 (= Fragment III) berichtet; nach Vereinigung von Fragment II und III zum *N*-Acyl-eikosa-peptid-amid und dessen Entacylierung zur „aminofreien Form“ (= Fragment IV) sollte letztlich die Aufknüpfung einer geeigneten *N*- und seitenketten-geschützten Teilsequenz 1—6 (= Fragment V) auf dieses Teilstück 7—27 zur Erstellung der Gesamtsequenz führen.

Die Synthese von Fragment V wurde im üblichen stufenweisen Anbauverfahren (vgl. Schema) ausgehend von Phenylalanin-methylester [6] mit Hilfe von Z-Thr(tBu)-OSU [5]<sup>4)</sup>, Z-Gly-OSU [4]<sup>5)</sup>, Z-Asp(OtBu)-OSU [3]<sup>6)</sup>, Z-Ser(tBu)-OSU [2]<sup>4)</sup> und letzten Endes AdOC-His(AdOC)-OSU [1]<sup>7)</sup> durchgeführt, wobei ab der Dipeptidstufe auf einen Veresterungsschutz der  $\alpha$ -Carboxylfunktion verzichtet wurde: AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH [1-6] konnte in chromatographisch und analytisch reiner Form in über 40proz. Ausbeute (berechnet auf H-Phe-OMe [6] als Startmaterial) erstellt werden.

<sup>1)</sup> III. Mittel.: E. Wünsch und P. Thamm, Chem. Ber. **104**, 2454 (1971).

<sup>2)</sup> II. Mittel.: E. Wünsch, G. Wendlberger und P. Thamm, Chem. Ber. **104**, 2445 (1971).

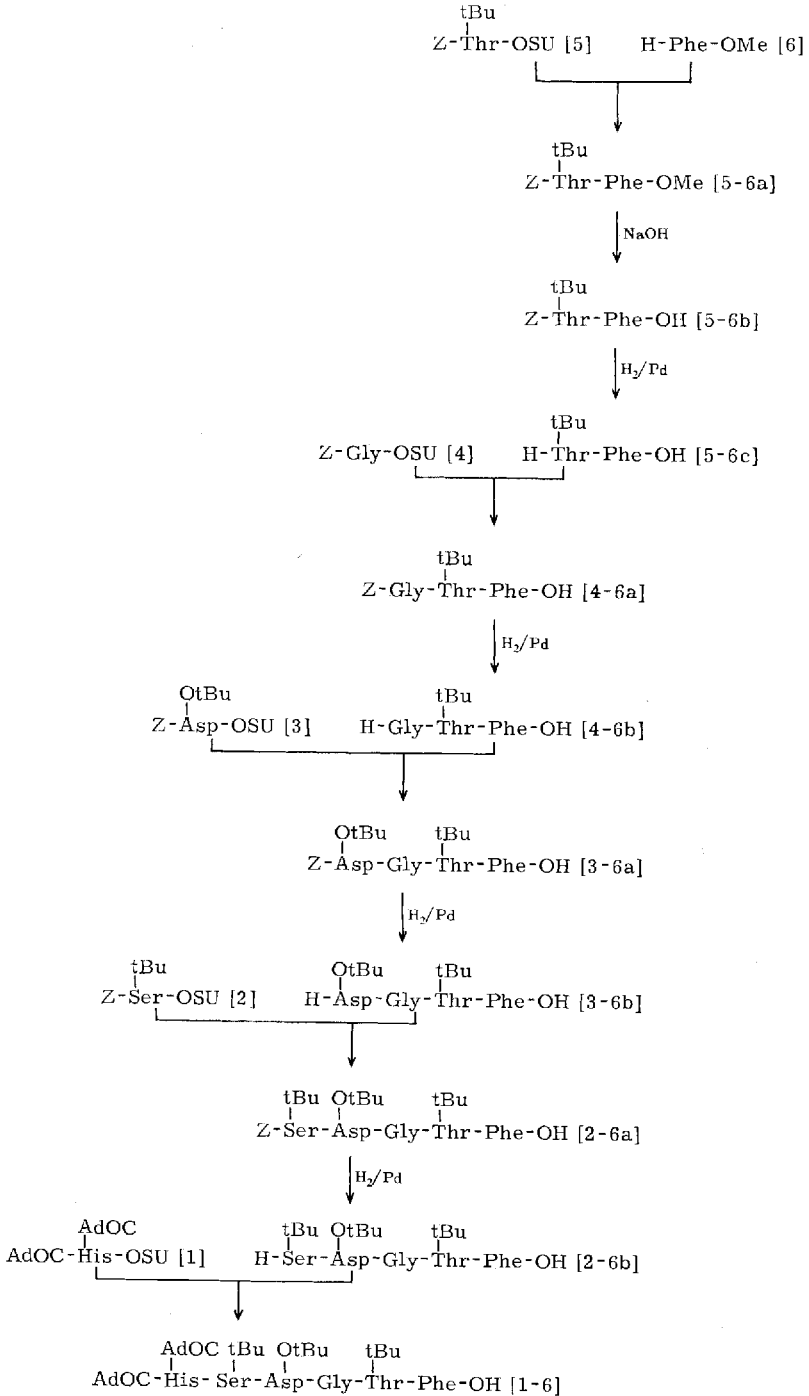
<sup>3)</sup> I. Mittel.: E. Wünsch, G. Wendlberger und A. Högel, Chem. Ber. **104**, 2430 (1971).

<sup>4)</sup> E. Wünsch, A. Zwick und A. Fontana, Chem. Ber. **101**, 326 (1968).

<sup>5)</sup> G. W. Anderson, J. E. Zimmermann und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).

<sup>6)</sup> E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **99**, 105 (1966).

<sup>7)</sup> E. Wünsch, A. Zwick und E. Jaeger, Chem. Ber. **101**, 336 (1968).



Den *Farbwerken Hoechst AG* sind wir wiederum für umfangreiche finanzielle und materielle Unterstützung zu hohem Dank verpflichtet. Ebenfalls danken wir der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für eine Beihilfe im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Synthese makromolekularer Naturstoffe“.

Den Herren *Otto Kraus* und *Jürgen Musiol* sind wir für vorbildliche technische Mitarbeit zu Dank verpflichtet; unser Dank gebührt ferner Fräulein *Regine Scharf* für die Ausführung der Aminosäureanalysen und Herrn *Wilhelm Beck* (Leiter des mikroanalytischen Labors der Abteilung) für die Ausführung der Elementaranalysen.

## Beschreibung der Versuche

Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert; sie wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli bzw. im Gerät „Mettler FP 1“ bestimmt. Die spezifischen Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss ermittelt, die Werte der D-Linie berechnet. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach den üblichen Verfahren der Dünnschicht- bzw. Papierchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen. Die Ausführung der Aminosäureanalyse geschah nach der Methode von *Stein* und *Moore* (Beckman 120 B mit Digital-Integrator).

1. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanin-dicyclohexylammonium-Salz* [5-6b·DCHA]

a) 170 g *H-Phe-OMe·HCl* [6] und 151 g *N-Methyl-morpholin* in 1500 ccm absol. Tetrahydrofuran werden bei 0° mit 305 g *Z-Thr(tBu)-OSU* versetzt; die Reaktionsmischung rührt man 2 Stdn. bei 0° und anschließend über Nacht bei Raumtemp. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wird der erhaltene Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte organische Phase wie üblich mit verd. Citronensäure- oder Kaliumhydrogensulfatlösung<sup>8)</sup>, Wasser und letztlich Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. eingedampft: farbloses Öl. Ausb. 352 g (quantitativ an *Z-Thr(tBu)-Phe-OMe* [5-6a]).

b) 352 g *Z-Thr(tBu)-Phe-OMe* [5-6a] — nach a) erhaltenes öliges Rohprodukt — in 1000 ccm Dioxan/Wasser (7 : 3) werden wie üblich „titrimetrisch verseift“. Der mit verd. Schwefelsäure neutralisierte Reaktionsansatz wird i. Vak. zur Entfernung des Dioxans auf ca. 300 ccm eingedampft und nach Übersichten mit 500 ccm Diäthyläther mit 2*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 1.5 angesäuert. Die abgetrennte Ätherphase, vereinigt mit zwei weiteren Ätherauszügen der verbliebenen wäßrigen Lösung, wird sulfatfrei gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und danach mit 135 g *Dicyclohexylamin* versetzt; die entstandene Fällung wird abfiltriert und i. Hochvak. bei 50° getrocknet; Schmp. 117–119°;  $[\alpha]_D^{20}$ : +46.1 ± 1° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +55.0° (c = 1; in Äthanol). Chromatographisch rein in Heptan/*n*-Butanol/Eisessig (5 : 1 : 1). Ausb. 392 g (80 %).

(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (637.9) Ber. C 69.67 H 8.69 N 6.59 O 15.05  
Gef. C 69.78 H 8.72 N 6.42 O 15.15

2. *O-tert.-Butyl-L-threonyl-L-phenylalanin* [5-6c]: 385 g *Z-Thr(tBu)-Phe-OH·DCHA* [5-6b·DCHA] werden wie üblich mit Kaliumhydrogensulfatlösung<sup>8)</sup> zersetzt und aufgearbeitet; das erhaltene ölige *Z-Thr(tBu)-Phe-OH* [5-6b] in 3000 ccm 80proz. Methanol wird sofort der katalytischen Hydrogenolyse (Palladiumschwarz) unterworfen. Das Filtrat vom Katalysator wird i. Vak. eingedampft, der erhaltene Rückstand aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Für das luftgetrocknete Material:  $[\alpha]_D^{20}$ : +48.4 ± 1° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +59.1°

<sup>8)</sup> E. Wünsch, R. Spangenberg und P. Thamm, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **352**, 655 (1971).

( $c = 1$ ; in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2). Ausb. 186 g (96%).

$C_{17}H_{26}N_2O_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$  (331.4) Ber. C 61.51 H 8.21 N 8.45 Gef. C 61.19 H 8.00 N 8.35

### 3. Glycyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*L*-phenylalanin [4-6b]

a) 183 g *H*-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [5-6c] und 111 g *N*-Methyl-morpholin in 1000 ccm absol. Tetrahydrofuran werden bei 0° mit 185 g *Z*-Gly-OSU [4]<sup>5)</sup> versetzt; die Reaktionsmischung wird bei 0° gerührt, bis dünnschichtchromatographisch der Verbrauch an Aminokomponente ermittelt war (ca. 20 Stdn.). Nicht umgesetztes *Z*-Gly-OSU wird durch Reaktion mit 2 Äquiv. *N*-[2-Amino-äthyl]-piperazin, berechnet auf den eingesetzten Überschub an Aktivester, in das Piperazid übergeführt (Reaktionszeit 2–3 Stdn. bei Raumtemp.).

Das Reaktionsgemisch wird schließlich i. Vak. eingedampft, der Rückstand zwischen Essigester und verd. Kaliumhydrogensulfatlösung verteilt; die abgetrennte organische Phase wird sorgfältig mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft: Öl, Ausb. 282.5 g (quantitativ berechnet für *Z*-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [4-6a]).

b) 282.5 g *Z*-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [4-6a] — nach a) erhaltenes öliges Rohprodukt — in 3000 ccm 85proz. Methanol werden wie üblich hydrogenolytisch entacyliert und aufgearbeitet. Nach Umkristallisieren aus Wasser: farblose Nadeln vom Schmp. 209° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ : +34.8 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +41.35° ( $c = 1.4$ ; in 10proz. Essigsäure); chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2); Ausb. 196 g (89%).

$C_{19}H_{29}N_3O_5 \cdot H_2O$  (397.5) Ber. C 57.41 H 7.86 N 10.57 O 24.15

Gef. C 57.40 H 8.09 N 10.67 O 24.16

### 4. *L*-Asparagyl(β-*tert*-butylester)-glycyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*L*-phenylalanin [3-6b]

a) 39.7 g *H*-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [4-6b] und 20 g *N*-Methyl-morpholin in 500 ccm Dimethylformamid werden bei 0° mit 44 g *Z*-Asp(*O*tBu)-OSU [3]<sup>6)</sup>, wie unter 3a) beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet: Öl, Ausb. 61.5 g (ca. 90%, berechnet für *Z*-Asp(*O*tBu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [3-6a]).

b) 61.5 g *Z*-Asp(*O*tBu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [3-6a] — nach a) erhaltenes öliges Rohprodukt — in 500 ccm 80proz. Methanol werden wie üblich der katalytischen Hydrogenolyse unterworfen und aufgearbeitet. Nach Umkristallisieren aus Methanol/Wasser: farblose Nadelchen von  $[\alpha]_D^{20}$ : +46.2 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +55.0° ( $c = 1.4$ ; in 80proz. Essigsäure); chromatographisch rein in Isoamylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30). Ausb. 47 g (ca. 90%).

$C_{27}H_{42}N_4O_8 \cdot 2 H_2O$  (586.7) Ber. C 55.28 H 7.90 N 9.54 Gef. C 55.63 H 7.95 N 9.47

5. Benzylloxycarbonyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-asparagyl(β-*tert*-butylester)-glycyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*L*-phenylalanin [2-6a]: 41 g *H*-Asp(*O*tBu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [3-6b] und 14 g *N*-Methyl-morpholin in 350 ccm Dimethylformamid werden, wie unter 3a) beschrieben, mit 30 g *Z*-Ser(*t*Bu)-OSU [2]<sup>4)</sup> umgesetzt und aufgearbeitet. Farblose Kristalle aus Diäthyläther: Schmp. 101–103°;  $[\alpha]_D^{20}$ : +28.4 ± 1° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : 32.9° ( $c = 1$ ; in Äthanol); chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Eisessig (45 : 45 : 10). Ausb. 56 g (79%).

$C_{42}H_{61}N_5O_{12} \cdot H_2O$  (846.0) Ber. C 59.63 H 7.51 N 8.28 Gef. C 59.60 H 7.51 N 8.17

6. *O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-asparagyl(β-*tert*-butylester)-glycyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*L*-phenylalanin [2-6b]: 55 g *Z*-Ser(*t*Bu)-Asp(*O*tBu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [2-6a] in 500 ccm 80proz. Methanol werden wie üblich katalytisch hydrogenolysiert und aufgearbeitet. Farbloses Pulver von  $[\alpha]_D^{20}$ : +28.4 ± 1° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +33.0° ( $c = 1$ ; in 80proz. Essigsäure); chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2). Ausb. 46 g (97%).

$C_{34}H_{55}N_5O_{10} \cdot 2 H_2O$  (729.9) Ber. C 55.95 H 8.15 N 9.59 O 26.30

Gef. C 55.97 H 8.22 N 9.51 O 26.71

7.  $N^{\alpha}, N^{im}$ -Bis-adamantylloxycarbonyl-*L*-histidyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-asparagyl( $\beta$ -*tert*-butylester)-glycyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*L*-phenylalanin [1-6]: 5.48 g *H*-Ser(*tBu*)-Asp(*OtBu*)-Gly-Thr(*tBu*)-Phe-OH [2-6b] und 1.65 ccm *N*-Methyl-morpholin in 100 ccm Dimethylformamid werden bei  $-5^{\circ}$  mit 7 g *AdOC*-His(*AdOC*)-OSU [1]<sup>7)</sup> versetzt. Die Reaktionslösung wird 24 Stdn. bei  $0^{\circ}$  und weitere 6 Stdn. bei Raumtemp. gerührt und schließlich i. Vak. eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird zwischen Essigsäureester und Kaliumhydrogensulfatlösung verteilt und die abgetrennte organische Phase wie üblich aufgearbeitet. Das erhaltene Material wird aus Essigester/Diäthyläther oder Aceton/Diäthyläther umgefällt. Schmp.  $140-145^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+19.9 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+23.3^{\circ}$  ( $c = 1$ ; in Methanol) oder  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+21.1 \pm 1^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+25.1^{\circ}$  ( $c = 1$ ; in Äthanol); chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2). Ausb. 8.3 g (93%).

$C_{62}H_{90}N_8O_{15} \cdot 1/2 H_2O$  (1196.5) Ber. C 62.24 H 7.67 N 9.36 O 20.73  
Gef. C 62.23 H 7.83 N 9.35 O 20.67

Aminosäureanalyse:	His	Ser	Asp	Gly	Thr	Phe
Ber.	1	1	1	1	1	1
Gef.	1.00	0.99	1.02	0.98	1.01	1.01

[344/71]